



TITLE:

腫瘍内ミトコンドリアCK濃度およびその臨床的意義：とくに消化器癌について

AUTHOR(S):

清水, 良一

CITATION:

清水, 良一. 腫瘍内ミトコンドリアCK濃度およびその臨床的意義：とくに消化器癌について. 日本外科宝函 1986, 55(1): 96-105

ISSUE DATE:

1986-01-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208597>

RIGHT:

腫瘍内ミトコンドリア CK 濃度およびその臨床的意義 —とくに消化器癌について—

山口大学医学部外科学教室第2講座（指導：石上浩一教授）

清水 良 一

〔原稿受付：昭和60年10月8日〕

Clinical Evaluation of Mitochondrial Creatine Kinase Level in Human Tumors

RYOICHI SHIMIZU

The 2nd Department of Surgery, Yamaguchi University School of Medicine
(Director: Prof. Dr. KOICHI ISHIGAMI)

Recently mitochondrial creatine kinase (CK) has been detected in patients with various malignant tumors, especially those with cancers of the gastrointestinal (GI) tract. In order to clarify its distribution in the GI tract, the author measured the mitochondrial CK activity in normal and malignant tissues of the alimentary tract by agarose gel electrophoresis using an antibody against the M monomer. The result of this study showed that mitochondrial CK was the predominant isoenzyme in malignant tissue, especially in gastric and colorectal cancers ($p < 0.05$, Fisher's exact method). Moreover the author was able to experience the following clinical cases. Mitochondrial CK was present in the sera from five of the 44 patients (11%) who were treated for cancer during the period from January, 1985 to June, 1985. The serum was obtained from the patients with cancer on the day before the operation. Two patients with colon cancer in mitochondrial CK positive group (40%) had undergone curative surgical procedure, and their mitochondrial CK level in sera turned into trace in immediate postoperative period. From these results, it seems that mitochondrial CK is the tumor associated marker of the GI tract.

緒 言

クレアチンキナーゼ (CK, EC 2.7.3.2) は細胞内酵素であり、二量体のアイソザイムとしては、4種 (MM,

MB, BB, MiMi) が報告されている³⁾。CK-MM および CK-MB については、筋疾患、心筋梗塞などの診断に利用され、臨床的価値は高い。近年、免疫阻害法を利用して、M サブユニットを抗 M 抗体で処理す

Key words: Tumor marker, Creatine kinase, Mitochondrial creatine kinase, Cancer of the alimentary tract, Agarose gel electrophoresis.

索引語：腫瘍マーカー、クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア CK、消化器癌、寒天電気泳動。

Present address: The 2nd Department of Surgery, Yamaguchi University School of Medicine, 1144 Kogushi, Ube 755, Japan.



図1. 上段：癌患者血清中のミトコンドリア CK
下段：コントロール

ること、CK-MiMi (ミトコンドリア CK) (図-1), CK-BB などのMサブユニットを含まない CK アイソザイム (以下 non CK-M) の測定が日常検査で行われるに至り, non CK-M の腫瘍マーカーとしての意義が唱えられはじめている²⁰⁾. 著者は, 体内での分布および局在についての報告が少ない CK-MiMi に注目し, 消化器系の諸組織における細胞内濃度を測定することにより, 消化器癌患者における CK-MiMi の血中への分泌可能部位を追求した。

対 象

(1) 腫瘍組織

腫瘍内の総 CK 濃度および CK アイソザイムを測定するために, 1985年1月より6月までの半年間に当施設で外科治療を受けた消化器系の進行癌27症例 (男性19例, 女性8例) の新鮮切除標本を用いた。内訳は, 食道癌5例, 胃癌9例, 結腸癌7例, 直腸癌3例, 肝細胞性肝癌2例および膵臓癌1例であった。本研究には, 最低2g以上の新鮮標本を使用した。このため, 研究用試料を採取すると永久組織標本作成に支障をきたすと判断した症例は, 進行癌であっても対象外とし, 早期癌症例については全例について, 対象から除外した。

(2) 正常組織

同期間中の29症例 (男性21例, 女性8例) を比較の対象とした。内訳は, 食道癌5例, 胃癌8例, 胃潰瘍1例, 結腸癌6例, 潰瘍性大腸炎1例および直腸癌4

例の計25例の切除標本より正常粘膜を2g以上採取し, 転移性肝癌2例および肝細胞性肝癌2例の計4例の切除標本より正常肝実質を2g以上採取した。肝細胞性肝癌の切除標本より採取した組織は, 肝硬変を認めたが, 非癌組織として採用した。

(3) 血中の総 CK 活性および non CK-M 活性

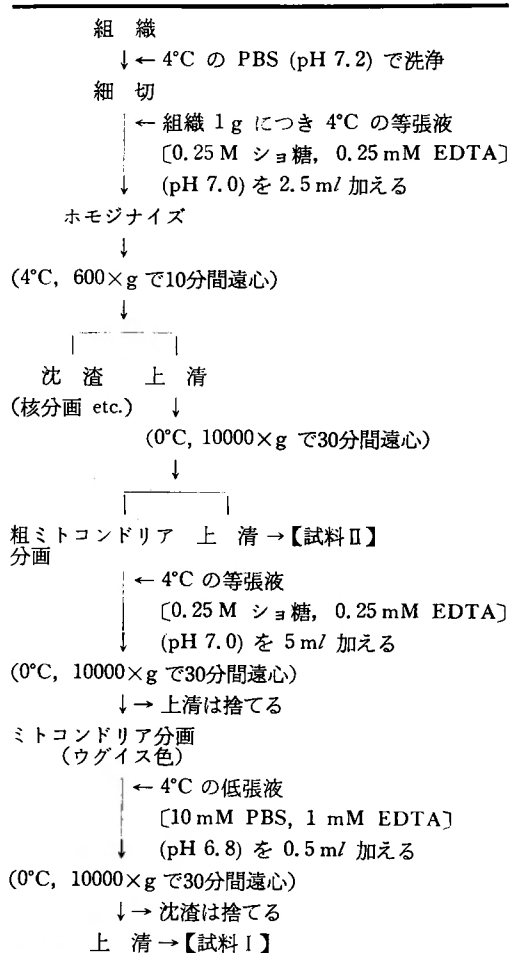
総 CK 活性およびMサブユニットを抗M抗体で阻害することで得られる non CK-M 活性を癌患者44例 (消化器癌42例, 乳癌2例) について測定した。また, 非癌患者についても, 細胞破壊が亢進していると考えられる消化器系の疾患6例について, 同様に測定した。癌患者44例の内訳は, 食道癌10例, 胃癌11例, 食道癌と胃癌の同時性重複癌1例, 結腸癌10例, 直腸癌4例, 胆管癌3例, 肝細胞性肝癌2例, 膵臓癌1例および乳癌2例であり, 非癌患者6例の内訳は, 潰瘍性大腸炎1例, 活動期の胃潰瘍1例, 絞扼性イレウスによる小腸広範壊死2例, 肝膿瘍1例および壊死性胆嚢炎1例であった。血清中の CK 活性の測定は手術前に行い, CK アイソザイムの検索により CK-MiMi 陽性例は, 手術後にも測定した。

方 法

(1) 試料の抽出 (遠心分画法による)²⁾

腫瘍および比較対象となる正常組織を各々2gずつ新鮮切除標本より採取し, これらを4°Cの等張リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄し, 細切した。次に, 4°Cの等張液 (0.25 M ショ糖, 0.25 mM EDTA, pH 7.0)

表1. 試料の作成方法 (遠心分画法による)



をそれぞれに 5 ml ずつ加え, Potter 型テフロンホモジナイザー (10 ml 用) にて, 周辺部より氷冷しながら, 600 rpm で90秒間に1~2回上下させてホモジナイズした。これらを 600×g で10分間遠心したのち, 上清を氷冷高速遠心分離機 (TOMINAGA, Model NO 90 UV) を用いて 0°C, 10000×g で30分間高速遠心し, これにより得た上清 (細胞質内の CK を含む液) を試料Ⅱとした。粗ミトコンドリア分画のウグイス色の沈渣に, 再度, 4°C の等張液 (0.25 M ショ糖, 0.25 mM EDTA, pH 7.0) を 5 ml ずつ加え, 0°C, 10000×g で30分間高速遠心し, ミトコンドリア分画をより純粋なものとした。次に, これらのウグイス色の沈渣に, 4°C の低張液 (10 mM リン酸緩衝液, pH 6.8, 1 mM EDTA を含む液) を 0.5 ml ずつ加え, 再度, 0°C,

10000×g で30分間高速遠心し, ミトコンドリアを破壊し, 得られた上清 (ミトコンドリア内 CK を含む液) を試料Ⅰとした (表-1)。

(2) CK 活性の測定とアイソザイムの決定

腫瘍および正常組織から抽出した試料Ⅰ, 試料Ⅱおよび患者血清について, 総 CK 活性は Merck-1-Test CK を, また, non CK-M 活性は Merck-1-Test CK-MB を用いて測定した²⁵⁾。CK アイソザイムの決定は, 寒天電気泳動で行った。まず, アガロース C (Pharmacia F. C.) 0.9 g をペロナール緩衝液 (pH 8.4, イオン強度0.05) 100 ml に溶解し, ガラス平板 (10×10 cm) 上に厚さ 1.5 mm の寒天平板を作成した。この平板を2枚用意した。試料Ⅰ, 試料Ⅱおよび患者血清を 10 μl ずつ塗布し, 4°C のもとに定電流 (5.4 mA/cm) で60分間通電した。通電後, 総 CK アイソザイムの決定には, イミダゾール緩衝液に溶いた2%寒天液と Merck-1-Test CK とを等量混合したものを, 泳動後の寒天平板上に重層し, また, non CK-M アイソザイムの決定には, 同様にして, Merck-1-Test CK-MB を用いて寒天平板上で酵素反応を行った²⁵⁾。酵素反応は, 37°C のもとに遮光状態で60分間行なった。次に, 室温, 遮光状態で, nitroblue tetrazolium 40 mg と phenazine methosulfate 0.4 mg を水 60 ml に溶解して作成した発色試薬に, 総 CK アイソザイム決定用と non CK-M アイソザイム決定用の平板を, それぞれ15分間浸した。最後に水洗して, 酢酸で反応を停止させ, デンシトメーターで CK アイソザイムを決定した。なお, 肉眼的に赤色を呈した試料については, イオン交換樹脂 (DEAE-Sephadex A-50) で CK を精製し, 次に, Sephacryl S-300 でゲル濾過し, 分子量を求め, さらに生化学的性状を Km 値で比較し, ミオキナーゼと区別した。

(3) 試料中の総蛋白量の測定

試料Ⅰ, 試料Ⅱの中に含まれる総蛋白量を Lowry 法²¹⁾で測定した。

(4) 統計解析

Fisher の直接確率法を採用した。

結 果

消化管および膀胱原発の癌細胞中に, CK アイソザイムの CK-MiMi と CK-BB が検出された。CK-MiMi は試料Ⅰに, また, CK-BB は主に, 試料Ⅱに検出された。比較の対象となった正常組織では, 試料

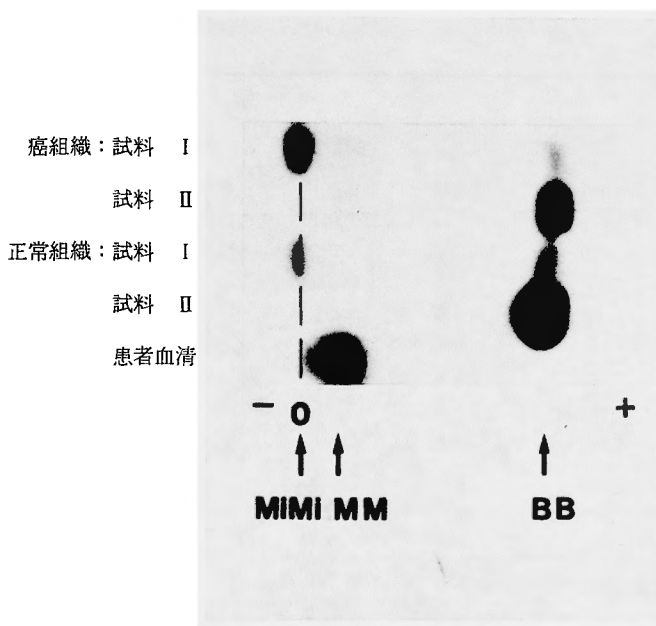


図2. 試料中の CK アイソザイム

IIに CK-BB が検出され、試料 I には、数症例に、CK-MiMi が検出できたにすぎなかった (図-2, 3) (表-2, 3). なお、肝細胞性肝癌については、試料 I には CK-MiMi は検出されず、試料 II にも少量の

CK-BB が存在するだけで、電気泳動で検出された酵素は、ほとんどが、分子量 25000 以下のミオキナーゼであった。このことは、正常肝および硬変肝についても同様であり、ミトコンドリアは比較的少量に採取で

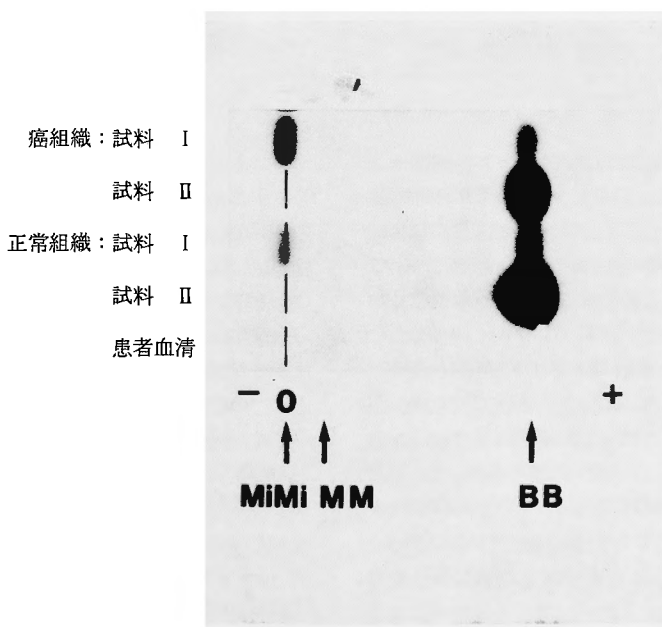


図3. 試料中の CK アイソザイム (抗M抗体処理)

表2. 消化器系諸組織における細胞内ミトコンドリア CK(CK-MiMi) 濃度
単位: (IU/g wet wt)

腫		瘍			
食道癌	胃 癌	結腸癌	直腸癌	膵臓癌+肝臓癌	
0.119	0.047	0.096	0.025	0.033	
0.028	0.011	0.055	0.075	(－)	
0.004	0.030	0.019	0.125	(－)	
(－)	0.051	0.044			
(－)	0.055	0.204			
	0.030	0.369			
	(－)	0.041			
	(－)				
	(－)				
計	5	9	7	3	3

正 常 組 織					
食 道	胃	結 腸	直 腸	膵 臓+肝 臓	
(－)	0.013	0.062	(－)	(－)	
(－)	0.015	0.003	(－)	(－)	
(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	
(－)	(－)	(－)	(－)	(－)	
(－)	(－)	(－)			
	(－)	(－)			
	(－)	(－)			
	(－)				
計	5	9	7	4	4

(－): trace

きたにもかかわらず、肝のミトコンドリア分画には、CK-MiMi は検出できなかった。また、CK-MM および CK-MB は、消化器系にはほとんど存在しないことが確認できた。細胞内 CK-MiMi 濃度については、癌組織の湿重量当たりの濃度分布を対数正規分布として、その90%下限点 (0.017 IU/g wet wt) をとり、この値を基準にして、これ以上を CK-MiMi 陽性、未満を陰性とした。これによると、全癌27例中18例がCK-MiMi 陽性であるのに対し、正常組織では、29例中1例のみが陽性であった(図-4)。この結果、消化器系の癌組織中には、正常組織に比較して有意に高濃度のCK-MiMi が存在することが判明した ($p<0.001$)。さらに、この傾向は胃癌、結腸癌および直腸癌に著明であった(表-4)。また、ミトコンドリア分画中に含まれる総蛋白量に対する CK-MiMi の比率 (IU/mg) に

についても消化器癌が正常組織に比較して、有意に高値を示すことが判明した ($p<0.001$) (図-5) (表-5, 6)。CK-BB に関しては、癌組織と正常組織の比較で、濃度の違いは不明であった。ただし、消化管の粘膜にはCK-BB が多量に含まれていることが確認できた²²⁾。血清中の CK 活性に関しては、手術に支障をきたすような筋疾患を有する症例はなく、CK-MM は、ほとんどの症例が正常値であった。non CK-M 活性については、1984年より、当施設の中央検査部で日常検査として測定が開始されており、正常値は男女共に 4~15 IU/L である。1985年1月から6月までに当科に入院した44例の癌患者 (男性31例、女性13例) についての non CK-M 活性は、44例中11例 (25%) が高値 (17~340 IU/L) を示し、この11例中5例 (男性4例、女性1例) にCK-MiMi が検出された。non CK-

表3. 消化器系諸組織における細胞内 CK-BB 濃度

単位: (IU/g wet wt)

腫		瘍		
食道癌	胃癌	結腸癌	直腸癌	脾臓癌+肝臓癌
39.6	7.6	66.8	121.0	0.7
8.3	28.1	14.4	64.1	5.7
48.5	130.0	11.7	39.1	(-)
11.9	8.6	57.0		
0.9	14.1	41.3		
	57.5	41.1		
	4.0	3.3		
	8.2			
	(-)			
計	5	9	7	3
正 常 組 織				
食 道	胃	結 腸	直 腸	脾 臓+肝 臓
14.0	56.0	75.9	180.0	1.9
24.9	49.0	69.1	152.0	1.6
25.3	3.7	126.0	68.2	2.7
123.0	13.1	38.1	85.1	3.1
37.2	50.0	44.5		
	13.1	110.0		
	11.8	43.8		
	39.6			
	65.1			
計	5	9	4	4

(-): trace

M活性が正常域であった他の33例に関しては、本法の測定感度では、CK-MiMi は検出できなかった。CK-MiMi が陽性の5例の内訳は、肝転移をきたした食道癌、胃癌および結腸癌が各1例、肺転移をきたした食道癌が1例、第3群リンパ節に巨大な転移巣を有した結腸癌が1例の計5例であった。手術に際して腫瘍を切除できたのは、結腸癌の2例のみであった。このうち、直径約5cmの肝転移巣が左葉2～4区域と右葉の6、7区域の2か所に認められた結腸癌症例においては、術前のCK-MiMiが26 IU/Lで、CEAも72.3 ng/ml (正常値 <5.8 ng/ml) と高値を示した。この症例は術前の検査でGOTが16 U/L (正常値1～20 U/L)、GPTも11 U/L (同1～17 U/L) と肝細胞障害は認めず、また、切除標本でも転移巣周囲の肝組織には壊死を認めず、転移した癌組織にのみ中心

壊死を認めた。術後35日目には、CEAは1.3 ng/ml、また、non CK-M活性も8 IU/Lと正常値に下がり、CK-MiMiも陰性となった。もう1例の結腸癌症例も術後には、CK-MiMiは陰性となった。以上のことより、術前の血清中のCK-MiMiは、腫瘍からの分泌が示唆された。

細胞破壊が亢進していると考えられた非癌患者6例では、肝臓癌、壊死性胆嚢炎および60cmの小腸壊死の3例はnon CK-Mが正常値であり、活動期の胃潰瘍、100cmの小腸壊死および潰瘍性大腸炎の3例にnon CK-M活性の高値(17～720 IU/L)を認めた。このうち潰瘍性大腸炎の1例で、血清中にCK-MiMiを認め、大腸全摘、経仙骨式回腸肛門吻合術の施行後にCK-MiMiは陰性となった。しかし、血清中のnon CK-M活性は、手術後2か月目もなお47 IU/L

表4. 消化器系の癌組織と正常組織での細胞内 CK-MiMi 濃度の比較

臓器別			+	-	計	p	
食 道	T		2	3	5	0.222	N S
	N		0	5	5		
胃	T		5	4	9	0.015	*
	N		0	9	9		
結 腸	T		7	0	7	0.002	**
	N		1	6	7		
直 腸	T		3	0	3	0.029	*
	N		0	4	4		
計	T		17	7	24	0.001	**
	N		1	24	25		
脾臓・肝臓	T		1	2	3	0.429	N S
	N		0	4	4		
消化器系全臓器	T		18	9	27	0.001	**
	N		1	28	29		

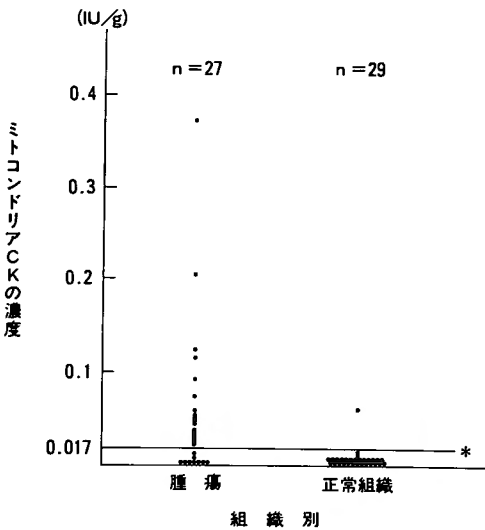
T : 癌組織 N : 正常組織
+ : 癌組織内の CK-MiMi 濃度を対数正規分布としてその90%下限点 (0.017 IU/g wet wt) 以上を示す例.
* : p<0.05 ** : p<0.01
以上 Fisher の直接確率法による.

と高値を示し、当施設の中央検査部で分析した結果、IgGκ と CK-BB が結合してできた Macro-CK-I²³ であることが判明した。この症例では病変部粘膜は炎症性ポリープ様変化が主体で、腫瘍性的変化が強かつ

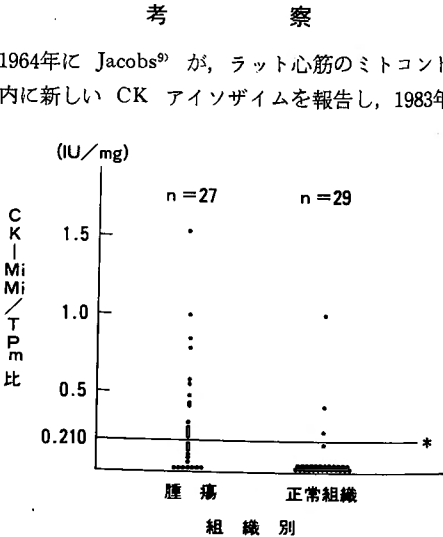
た。同粘膜より得た CK-MiMi の濃度は 0.042 IU/g wet wt であり、この値は消化器癌に認められた組織内濃度に匹敵するものであった。なお、同症例の正常粘膜からは、CK-MiMi は検出されなかった。

考 察

1964年に Jacobs⁹⁾ が、ラット心筋のミトコンドリア内に新しい CK アイソザイムを報告し、1983年に



* 腫瘍の分布の90%下限点
図4. ミトコンドリア CK の腫瘍および正常組織内濃度



* 腫瘍の分布の90%下限点
図5. ミトコンドリア分画に含まれる総蛋白量 (TPm) に対する CK-MiMi の割合

表5. 消化器系諸組織におけるミトコンドリア分画内総蛋白量に
対する CK-MiMi の割合

単位: (IU/mg)

		腫		瘍	
	食道癌	胃癌	結腸癌	直腸癌	膵臓癌+肝臓癌
	0.15	0.57	0.26	0.22	0.43
	0.25	0.44	1.53	0.48	(-)
	0.09	0.19	0.11	1.00	(-)
	(-)	0.16	0.59		
	(-)	0.31	0.86		
		0.20	0.80		
		(-)	0.27		
		(-)			
		(-)			
計	5	9	7	3	3
正 常 組 織					
	食 道	胃	結 腸	直 腸	膵 臓+肝 臓
	(-)	0.26	1.00	(-)	(-)
	(-)	0.20	0.40	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)		
		(-)	(-)		
		(-)	(-)		
		(-)			
計	5	9	7	4	4

(-): trace

は, Blum ら³⁾が, ヒト心筋のミトコンドリア由来の CK の結晶撮影に成功し, CK-MiMi として報告した。一方では, 近年, atypical CK として Macro-CK-I, Macro-CK-II といった分子量の大きい Macro-CK^{4,10,16,19,26)}の報告が相次いだが, 現在では, 免疫グロブリンと CK-BB の結合したものが Macro-CK-I²³⁾, また, ミトコンドリア CK の重合により分子量が35万にもなるものが Macro-CK-II であると報告されている^{12,13)}。この結果, CK には電気泳動によって陰極側より CK-MiMi, CK-MM, CK-MB, CK-BB の順に検出される4種類の CK アイソザイムが判明した^{3,6)}。CK は細胞内酵素であり, 組織の破壊が生じた際に血中に逸脱することから, 体内各種臓器についての CK アイソザイムの局在が判明しておれば, 血

中の CK アイソザイムの測定により, 組織障害の部位および程度を容易に知ることができる。現に, CK-MM については各種筋疾患等に広く臨床応用され, CK-MB についても心筋障害, とくに心筋梗塞の診断に利用されてきた¹¹⁾。CK-BB については, 脳外科領域の術後に上昇することが, 以前より知られていたが, 近年, 腫瘍マーカーとしての意義も唱えられはじめている^{1,8)}。CK-MiMi については, 現在までにアルコール性肝硬変症および心筋梗塞のように, 細胞内にミトコンドリアが豊富に存在する臓器の細胞破壊が進行する例で, 血清中に検出されたという報告がある^{10,24)}。ところが, 最近になって, 消化器系をはじめとする各種癌患者の血清中に, 陽性例が報告され, CK-MiMi についても腫瘍マーカーとしての臨床的意義が唱えられ

表6. CK-MiMi とミトコンドリア内総蛋白量 (TPm) の比に
関する癌組織と正常組織の比較

臓器別			+	-	計	p	
食 道	T		1	4	5	0.500	N S
	N		0	5	5		
胃	T		3	6	9	0.288	N S
	N		1	8	9		
結 腸	T		6	1	7	0.051	*
	N		2	5	7		
直 腸	T		3	0	3	0.029	*
	N		0	4	4		
計	T		13	11	24	0.002	* *
	N		3	22	25		
膵臓・肝臓	T		1	2	3	0.429	N S
	N		0	4	4		
消化器系全臓器	T		14	13	27	0.001	* *
	N		3	26	29		

T : 癌組織
N : 正常組織
+ : 癌組織の CK-MiMi/TPm 比 (IU/mg) を対数正規分布としてその90%
下限点 (0.210 IU/mg) 以上を示す例。
* . p<0.05 ** : p<0.01
以上 Fisher の直接確率法による。

はじめた^{15,17)}。CK-MiMi は、他の CK アイソザイムと異なり、その体内における分布および局在についての報告は少なく⁵⁾、また、癌患者の血清中に出現するCK-MiMi が、どの組織に由来するかを報告した文献も少ない。今のところ、CK-MiMi の血中陽性例は、肝、肺および骨等への遠隔転移をきたした予後不良の症例に報告が多く^{7,14,18)}、Kanemitsu ら¹³⁾は、肝転移をきたした症例では、CK-MiMi が腫瘍により障害を受けた肝細胞から血清中に逸脱すると報告している。著者は日常の診療において、術後肝炎や肝硬変症といった肝細胞障害をきたす疾患によく遭遇し、これらの症例で GOT, GPT が上昇しているにもかかわらず、non CK-M 活性が正常値を示す症例を、しばしば経験した。また、このたびの研究で、消化器系、とくに、消化管の癌細胞中に、正常組織に比較してCK-MiMi が高濃度に存在することも確認した。さらに、切除した腫瘍組織に、中心壊死をしばしば認め、これは腫瘍内酵素が容易に、しかも持続的に血中に逸脱する可能性を示唆している。以上のことより、著者は、癌患者における血清中のCK-MiMi は、腫瘍から分泌されたものとする。なお、本研究期間中において、血清中

にCK-MiMi を認め、かつ、肝転移を認めた結腸癌の1治験例は、手術前後のCK-MiMi の推移より、これが腫瘍マーカーになり得ることを証明するものとする。また、非癌患者6例の臨床例より、腫瘍性変化をきたしていなければ、たとえ消化器系の組織に広範な障害、壊死が生じて、CK-MiMi は血清中には出現しないことも示唆された。著者は、CK-MiMi の測定感度が向上すれば、治療切除可能な消化器系の悪性腫瘍を、比較的早期の段階でスクリーニングできるものとする。

結 語

消化器系の進行癌27例について、腫瘍内のCK-MiMi (ミトコンドリアCK) の濃度を測定し、正常組織に比較して、高値を示すことを確認した。また、著者は、術前の血清中にCK-MiMi を認めた結腸癌の術後に、CK-MiMi が陰性となった例を2例経験した。この結果、CK-MiMi の臨床的意義として、消化器系の腫瘍マーカーとなり得ることを報告した。

稿を終えるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました石上浩一教授に深く感謝の意を表するとともに、今回の

研究に御協力いただいた教室諸兄に深謝します。また試料の作成および測定に御協力いただいた臨床検査医学講座宮地隆興教授、生化学第一講座中村和行博士および医療技術短期大学部衛生技術学科岡野こずえ先生に深謝します。

なお本論文の要旨は第72回日本消化器病学会総会（新潟）で発表した。

参 考 文 献

- 1) 赤沼志げ子, 上嶋一江: CPK isoenzyme 分離法と臨床的应用に関する検討. 衛生検査 **27**: 695-698, 昭53.
- 2) 阿南功一, 紺野邦夫, 他: 基礎生化学実験法 I, 生物材料の取扱ひ方. 東京, 丸善株式会社: 311-342, 昭49.
- 3) Blum HE, Deus B, et al: Mitochondrial creatine kinase from human heart muscle: Purification and characterization of the crystallized isoenzyme. J Biochem **94**: 1247-1257, 1983.
- 4) Bohner J, Stein W, et al: Macro creatine kinases: Results of isoenzyme electrophoresis and differentiation of the immunoglobulin-bound type by radioassay. Clin Chem **28**: 618-623, 1982.
- 5) DeLuca M, Hall N, et al: Creatine kinase isozymes in human tumors. Biochem Biophys Res Commun **99**: 189-195, 1981.
- 6) Grace AM, Perryman MB, et al: Purification and characterization of human mitochondrial creatine kinase. J Biol Chem **258**: 15346-15354, 1983.
- 7) Heinz JW, O'Donnell NJ, et al: Apparent mitochondrial creatine kinase in the serum of patient with metastatic cancer to the liver. Clin Chem **26**: 1908-1911, 1980.
- 8) 石黒士雄, 伊藤喬廣, 他: 神経芽細胞腫と Creatine kinase. 日小外会誌 **21**: 371 (抄録), 1985.
- 9) Jacobs H, Heldt HW, et al: High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. Biochem Biophys Res Commun **16**: 516-521, 1964.
- 10) James GP and Harrison RL: Creatine kinase isoenzymes of mitochondrial origin in human serum. Clin Chem **25**: 943-947, 1979.
- 11) 金井正光: クレアチンフォスフォキナーゼ. 臨床医 **9**: 1854-1858, 昭58.
- 12) Kanemitsu F, Kawanishi I, et al: Characteristics of mitochondrial creatine kinases from normal human heart and liver tissues. Clin Chim Acta **119**: 307-317, 1982.
- 13) Kanemitsu F, Kawanishi I, et al: The origin of a cathode-migrating creatine kinase found in serum from a cancer patient. Clin Chim Acta **122**: 377-383, 1982.
- 14) Kanemitsu F, Kawanishi I, et al: Mitochondrial creatine kinase as a tumor-associated marker. Clin Chim Acta **138**: 175-183, 1984.
- 15) Koven IH, Freedman M, et al: Macro-creatine kinase 2: A possible marker of gastrointestinal cancer? Surgery **94**: 631-635, 1983.
- 16) Kwong TC and Arvan DA: How many creatine kinase "isoenzymes" are there and what is their clinical significance? Clin Chim Acta **115**: 3-8, 1981.
- 17) Liu TZ, Shen JT, et al: Atypical cathode-migrating creatine kinase isoenzyme and human breast carcinoma: A specific marker? Clin Chem **26**: 1765 (letter), 1980.
- 18) Liu TZ: Atypical cathodically migrating creatine kinase: a possible tumor-associated enzyme marker for disseminated malignancy. Clin Chem **28**: 1560 (abstract), 1982.
- 19) Martys TH, Albrich E, et al: Makro-CK-BB-Ämie: Ein seltenes differentialdiagnostisches Problem im frühen Infarktstadium. Wien Med Wschr **133**: 257-260, 1983.
- 20) 岡野こずえ, 宮地隆興, 他: 各種疾患における血清クレアチンキナーゼおよび non-M サブユニット活度の評価. 臨床病理 **32**: 181-185, 昭59.
- 21) 柴田 進: 臨床化学の実技. 定量篇. 東京, 金原出版: 515-518, 昭46.
- 22) Tsung SH: Total CK activity and isoenzyme patterns in normal and neoplastic tissue of gastrointestinal tract. J Clin Pathol **35**: 204-206, 1982.
- 23) Urdal P: Macro creatine kinase BB isoenzyme in serum: most likely an antigen-autoantibody complex. Scand J Clin Lab Invest **41**: 499-505, 1981.
- 24) Wu AHB, Herson VC, et al: Macro creatine kinase types 1 and 2: Clinical significance in neonates and children as compared with adults. Clin Chem **29**: 201-204, 1983.
- 25) 山本昇秀, 宮地隆興, 他: 阻害抗体を用いた CK-B サブユニット測定試薬 Merck-1-Test に関する検討. 臨床検査機器・試薬 **6**: 405-412, 昭58.
- 26) Yuu H, Takagi Y, et al: Creatine kinase isoenzyme of high relative molecular mass in serum of a cancer patient. Clin Chem **24**: 2054-2057, 1978.